

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

Generate Collection

L14: Entry 374 of 590

File: DWPI

May 27, 1995

DERWENT-ACC-NO: 1996-038608

DERWENT-WEEK: 199604

COPYRIGHT 2003 DERWENT INFORMATION LTD

**TITLE:** Prepn. of pyo-bacteriophage - comprises separate cultivation of the bacteria and their phage(s), combining the resulting phago-lysates, stirring, ultrafiltration and final sterilising micro-filtration

**INVENTOR:** GORBATKOVA, G A; KAZAKOVA, T B ; VOROSHILOVA, N N

**PRIORITY-DATA:** 1992SU-5030309 (March 2, 1992)

**PATENT-FAMILY:**

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
RU 2036232 C1	May 27, 1995		005	C12N003/00

**INT-CL (IPC):** C12 N 3/00

**ABSTRACTED-PUB-NO:** RU 2036232C

**BASIC-ABSTRACT:**

Pyobacteriophage is obtd. more efficiently by growing the bacteria and corresp. bacteriophages of *Streptococcus*, *Bacillus pyocyanus*, *E. coli*, *Proteus* and additional *Klebsiella* separately in liq. media, and combining the resulting phagolysates. Subsequent microfiltration through a membrane with 0.2  $\mu$  pores is followed by ultrafiltration to remove bacterial metabolites and proteins, and final sterilising microfiltration.

**USE** - The method is used in prodn. of medicinal preps.

**ADVANTAGE** - Purer prepn., with time of process reduced from 30-34 to 4-6 hrs., is obtd.

**ABSTRACTED-PUB-NO:** RU 2036232C

**EQUIVALENT-ABSTRACTS:**

**CHOSEN-DRAWING:** Dwg.0/0



(19) RU (11) 2 036 232 (13) C1  
 (51) МПК<sup>6</sup> C 12 N 3/00

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 5030309/13, 02.03.1992

(46) Дата публикации: 27.05.1995

(56) Ссылки: 1. Прозоровский С.П. и Генчиков А.А. Принципы борьбы с внутрибольничными инфекциями. 2. Регламент производства пиобактериофага комбинированного жидкого N 242 - 8. Тбилисский НИИВС.

(71) Заявитель:  
 Уфимский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова

(72) Изобретатель: Ворошилова Н.Н., Казакова Т.Б., Горбяткова Г.А., Боговазова Г.Г., Афанасьева Э.В., Бондаренко В.М.

(73) Патентообладатель:  
 Уфимский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПИОБАКТЕРИОФАГА

(57) Реферат:

Использование: биотехнология, производство медицинских биологических препаратов. Сущность способа: проводят культивирование бактерий и бактериофагов стафилококка, стрептококка, синегнойной палочки, кишечной палочки, протея и клебсиелл в жидкой питательной среде. Каждый вид бактерий и бактериофагов культивируют раздельно, но условия культивирования являются общими для всех видов. Культивирование проводится в условиях интенсивной аэрации и перемешивания при 30 - 70%-ном насыщении растворенным кислородом культуральной среды с использованием экспоненциально

размножающейся бактериальной популяции. Полученные фаголизаты всех бактериофагов сводят в единый объем, перемешивают и подвергают микро- и ультрафильтрации в режиме тангенциального потока через мембранны с размером пор 0.2 мкм и мембранны с порогом задержания вещества 150 - 200 КД, после чего проводят заключительную стерилизующую микрофильтрацию. Степень очистки бактериофагов от метаболитов бактерий и белков среды составляет 98 ± 1.1%. Способ позволяет расширить спектр антибактериальной активности препарата и обеспечивает высокий выход биомассы бактериофагов, 2 табл.

R  
U  
2  
0  
3  
6  
2  
3  
2  
C  
1

1  
C  
1  
2  
3  
2  
C  
1  
RU  
2  
0  
3  
6  
2  
3  
2  
C  
1



(19) RU (11) 2 036 232 (13) C1  
 (51) Int. Cl. 6 C 12 N 3/00

RUSSIAN AGENCY  
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 6030309/13, 02.03.1992

(46) Date of publication: 27.05.1995

(71) Applicant:  
 Ufimskij nauchno-issledovatel'skij institut  
 vakkzin i syvorotok im.I.I.Mechnikova

(72) Inventor: Voroshilova N.N.,  
 Kazakova T.B., Gorbatkova G.A., Bogovazova  
 G.G., Afanaseva Eh.V., Bondarenko V.M.

(73) Proprietor:  
 Ufimskij nauchno-issledovatel'skij institut  
 vakkzin i syvorotok im.I.I.Mechnikova

(54) METHOD OF PYOBACTERIOPHAGE PREPARING

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: method involves cultivation of bacteria and bacteriophages of *staphylococcus*, *streptococcus*, *pyocyanic* bacillus, *Escherichia coli*, *Proteus* and *Klebsiella* on the liquid nutrient medium. Every species of bacterium and bacteriophage is cultured separately but under similar conditions of cultivation for all species. Cultivation is carried out under conditions of intensive aeration and stirring of medium using exponentially multiplying bacterial population. Prepared phage lysates of all

bacteriophages were combined to the total volume, stirred and subjected for micro- and ultrafiltration at the regime of tangential flow through membrane (pore size is 0.2 mcm) and membranes showing retaining threshold of substances with molecular mass 150-200 kDa, and then final sterilizing microfiltration is carried out. Purification degree of bacteriophages from bacterium metabolites and medium proteins is 98± 1.1%. EFFECT: broadened spectrum of antibacterial activity of preparation, increased yield of bacteriophage biomass. 2 tbi

R  
U

2  
0  
3  
6  
2  
3  
2

C  
1

RU 2 0 3 6 2 3 2 C 1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к производству медицинских биологических препаратов.

Гнойно-воспалительные заболевания, вызванные бактериями стафилококка, стрептококка, синегнойной и кишечной палочкой, протея, широко распространены и трудно поддаются антибиотикотерапии, часто заканчиваются смертельный исходом, особенно у детей раннего возраста. В последние годы наряду с перечисленными возбудителями в 10-30% случаев от больных выделяются бактерии клебсиелл пневмонии.

Известен препарат пиобактериофага комбинированного, включающий бактериофаги стафилококка, стрептококка, синегнойной палочки, кишечной палочки и протея. Способ получения пиобактериофага предусматривает раздельное статическое культивирование бактериофагов в жидкой питательной среде в бутылках с использованием одновременного добавления в питательную среду бактериальных клеток до концентрации  $3 \cdot 10^7$  в 1 мл, находящихся в стадии отмирания (18-часовая культура) и маточного фага в количестве 0,2% от объема среды, без учета множественности заражения и урожайности бактериофагов с последующей стерилизацией микрофильтрацией в тупиковом режиме через керамические фильтры (свечи Шамберлана).

Недостатками известного способа являются:

низкий выход биомассы бактериофагов при их культивировании, обусловленный фазой развития (фаза отмирания) бактериальной популяции, использующейся для размножения фагов, а также неоптимизированными условиями культивирования;

нетехнологичность, связанная с использованием для стерилизующей микрофильтрации тупикового режима, керамических фильтров, обладающих низкой производительностью в связи с фильтрацией в тупиковом режиме;

нетехнологичность способа, обусловленная получением фагов в бутылках и невозможность получения препарата в больших объемах;

реактогенность препарата, связанная с присутствием в составе препарата белков питательной среды и метаболитов бактериальных клеток, образующихся в процессе роста бактериальной популяции, а также при фаголизисе;

недостаточно широкий спектр действия препарата, связанный с отсутствием в составе препарата бактериофагов клебсиелл пневмонии;

длительность технологического цикла более 30 ч.

Целью изобретения является разработка нового способа получения пиобактериофага и расширения спектра действия препарата.

Для этого в состав препарата, содержащего бактериофаги стафилококка, стрептококка, синегнойной палочки, кишечной палочки и протея, дополнительно вводят бактериофаги клебсиелл, получение бактериофагов проводят с использованием экспоненциально размножающейся бактериальной популяции в жидкой питательной среде с последующей очисткой препарата путем микро- и ультрафильтрации

в режиме тангенциального потока. Микрофильтрацию проводят на мембранах с размером пор 0,2 мкм, а ультрафильтрацию на мембранах с порогом задержания веществ 150-200 КД. После очистки проводят стерилизующую микрофильтрацию.

Сравнение существенных признаков предлагаемого технического решения и прототипа показывает, что общим для них является процесс культивирования в жидкой питательной среде для получения биомассы фагов стафилококка, стрептококка, синегнойной, кишечной палочки и протея, в тоже время процесс заключительной стерилизующей микрофильтрации фаголизатов для удаления бактериальных клеток.

Отличительными существенными признаками предлагаемого способа являются: введение в состав препарата бактериофагов клебсиелл пневмонии, позволяющее на  $75 \pm 2\%$  расширить спектр биологической активности препарата в отношении бактерий клебсиелл пневмонии и расширить показания к его применению (в прототипе компонент бактериофагов клебсиелл пневмонии отсутствует);

использование вместо статического культивирования на бактериальных клетках в стадии отмирания без учета урожайности фагов и множественности заражений (прототип) периодического динамического управляемого культивирования на экспоненциально размножающейся бактериальной популяции, позволяющей повысить на 50-90% выход биомассы фагов;

очистка препарата микрофильтрацией через мембранные с размером пор 0,2 мкм и ультрафильтрацией в режиме тангенциального потока на плоских мембранных УПМП с порогом задержания веществ 150-200 КД для очистки препарата фагов от метаболитов бактерий и белков питательной среды и снижения реактогенности и токсичности препарата при полостном введении. Степень очистки в сравнении с прототипом  $98 \pm 1,1\%$ .

В литературе описан способ получения бактериофагов антробактерий (авт. св. N 1058283), предусматривающий периодическое динамическое культивирование на экспоненциально размножающейся бактериальной популяции.

Однако использование экспоненциально размножающейся бактериальной популяции для получения стафилококкового, стрептококкового, синегнойного бактериофагов в литературе не описано.

Описанный в литературе способ очистки бактериофагов (авт. св. N 1412302) включает в себя четыре этапа: микрофильтрацию, которая проводится в тупиковом режиме в три этапа (на фильтр-картоне, на целлюлозных мембранных с размером пор 0,5-0,7 мкм, затем на целлюлозных мембранных с размером пор 0,2 мкм) и четвертый этап очистки фаголизатов методом ультрафильтрации в режиме тангенциального потока через полые волокна с порогом задержания веществ 100 КД. Предлагаемый способ включает двухэтапную очистку: микрофильтрацию в режиме тангенциального потока на капроновых мембранных с размером пор 0,2 мкм и очистку ультрафильтрацией в режиме

R  
U  
2  
0  
3  
6  
N  
C  
1

C1  
C2  
3  
2  
3  
6  
2  
0  
3  
6  
U

тangenциального потока на плоских мембранах с размером пор 150-200 КД. Предлагаемый способ микрофильтрации на капроновых мембранах более технологичен, производителен и выдерживает 50-70 циклов в отличие от одноразовых целлюлозных мембран и фильтр-картона. Плоские мембранны для ультрафильтрации имеют размер пор 150-200 КД, они более производительны, чем модули с полыми волокнами, вследствие большей скорости потока на плоскорамных установках, определяемой диаметром просвета волокна (полые волокна) и высотой камеры (плоскорамная установка). Использование полых волокон не позволяет в отличие от плоских мембран удалять из фаголизатов вещества, в том числе и фракции эндотоксина, образующиеся при фаголизисе, с молекулярной массой более 100 КД. Очистка на полых волокнах фаголизатов, полученных на таких средах, как мясопептонный бульон и бульон Мартена, содержащих высокомолекулярные фракции белков и пептидов, практически невозможна вследствие образования слоя белка на внутренней поверхности волокон и замедления фильтрации из-за белок-белковых взаимодействий. На плоскорамных установках фаголизаты, полученные на мясопептонном бульоне и бульоне Мартена, фильтруются также хорошо, как и фаголизаты, не содержащие высокомолекулярных белков и пептидов питательных сред.

Проведенный анализ свидетельствует, что предлагаемая совокупность существенных признаков является новой, в влияние отличительных от прототипа существенных признаков на достижение технического результата не следует из известного уровня техники, т.е. предлагаемый способ соответствует критериям "новизна" и "изобретательский уровень".

П р и м е р 1. Способ получения пиобактериофага.

Способ культивирования бактериофагов, входящих в состав препарата пиобактериофага, является общим для всех. Культивирование бактериофагов проводят на бульоне Мартена, Хоттингера, мясопептонном бульоне или бульоне на основе ферментативного гемогидролизата. Культивирование проводят в ферментерах в условиях интенсивной взаимации и перемешивания при 30-70%-ном насыщении растворенным кислородом с использованием экспоненциальной размножающейся бактериальной популяции. Каждый вид бактериофагов культивируют раздельно. Для этого в питательную среду вносят бактериальную культуру до конечной концентрации  $5 \cdot 10^7$  бакт. кл/мл и выращивают при 37°C в условиях 30-70%-ного насыщения кислородом в течение 1,0-1,5 ч до концентрации  $2-5 \cdot 10^8$  бакт. кл/мл, после чего заражают бактериофагом с множественностью заражения 1/30 и культивируют в том же режиме в течение 1-2 ч до полного лизиса бактериальной популяции, после чего все бактериофаги сводят в единый объем, перемешивают и фильтруют в режиме тangenциального потока через фильтры с размером пор 0,2 мкм. Время фильтрации 100 л препарата составляет 10 мин.

5 Отфильтрованный фаголизат очищают путем фильтрации через плоскорамный аппарат УФР-4М в режиме тangenциального потока через мембранны с порогом задержания веществ 150-200 КД. Степень очистки бактериофагов от метаболитов бактериальных клеток составляет  $98 \pm 1,1$ . Затем очищенный препарат пиобактериофага фильтруют через стерильные фильтры типа "Владивосток" с размером пор 0,2 мкм, после чего стерильно разливают в ампулы и флаконы и используют для лечения.

10 Как видно из табл. 1, использование предлагаемого способа позволяет:

15 повысить на 50-90% выход биомассы фагов при культивировании и сократить время культивирования в среднем на 21 ч ( $P < 0,05, P < 0,001$ );

20 очистить препарат от метаболитов бактерий и белков среды на  $98 \pm 1,1\%$

25 повысить производительность и сократить время стерилизующей микрофильтрации в среднем на 8 ч;

30 сократить время технологического цикла в среднем на 25 ч ( $P < 0,001$ ).

П р и м е р 2. Биологические свойства препарата бактериофага.

35 Препаратор очищенного бактериофага, полученный предлагаемым способом, обладает активностью в отношении бактерий клебсиелл пневмонии  $75 \pm 2\%$  (табл. 2). Как видно из табл. 2, пиобактериофаг, полученный предлагаемым способом, в сравнении с прототипом был очищен от метаболитов бактериальных клеток и белков питательной среды. Степень очистки по белку составляет  $98 \pm 1,1\%$ .

40 Препаратор очищенного пиобактериофага в отличие от прототипа не обладал токсическими свойствами при внутрибрюшинном введении препарата белым мышам в дозе, в 3500 раз превышающей максимальную разовую для человека в пересчете на ед. массы тела. Гибели животных, падения массы тела и патологических изменений внутренних органов не обнаружено.

45 Кроме того, препарат очищенного пиобактериофага в отличие от прототипа не обладал токсическими свойствами при внутрибрюшинном введении в течение 21 дн в терапевтических дозах в расчете на ед. массы тела (хроническая токсичность). Препаратор обладал антибактериальной активностью в отношении бактерий стафилококка в титре  $10^5 \cdot 10^6$  по Аппельману, в титре  $10^6 \cdot 10^7$  в отношении бактерий стрептококка. Активность компонентов бактериофагов кишечной и синегнойной палочек, протея также находилась в пределах  $10^5 \cdot 10^6$  по Аппельману (табл. 2). В отличие от прототипа препарат очищенного пиобактериофага обладал антибактериальной активностью в отношении бактерий клебсиелл пневмонии в титре  $10^5 \cdot 10^7$ .

50 Таким образом, использование предлагаемого способа получения препарата пиобактериофага позволяет расширить на  $75 \pm 2\%$  спектр антибактериальной активности в отношении бактерий клебсиелл пневмонии, а также позволяет повысить качество за счет снижения токсических свойств препарата при полостном внутрибрюшинном введении за счет удаления в процессе очистки  $98 \pm 1,1\%$  из

1 C 1  
2 C 2  
3 C 3  
2 C 2  
6 C 6  
3 C 3  
2 C 2  
0 C 0  
2 C 2  
U C 1

R U  
2 0  
3 0  
6 0  
2 0  
3 0  
2 0  
C 1

состава препарата метаболитов бактериальных клеток и белков культуральной среды.

Кроме того, использование предлагаемого способа позволяет повысить выход на 50-90% биомассы бактериофагов при их культивировании, сократить время культивирования в среднем на 21 ч, повысить производительность и сократить время технологического цикла фильтрации в среднем на 25 ч и вести крупномасштабное производство.

Внедрение препарата очищенного пиобактериофага позволит дать практическому здравоохранению эффективный антибактериальный препарат, превосходящий по своей активности как антибиотики широкого спектра действия, так и антибиотики резерва, отличительным признаком которого в отличие от антибиотиков является отсутствие

токсичности.

**Формула изобретения:**

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПИОБАКТЕРИОФАГА, включающий культивирование бактерий и бактериофагов стафилококка, стрептококка, синегнойной палочки, кишечной палочки и протея в жидкой питательной среде с последующим съедением в один объем и стерилизующей микрофильтрацией, отличающийся тем, что дополнительно проводят культивирование бактерий и бактериофагов клебсиеллы, для получения фаголизатов используют бактерии-продуценты в экспоненциальной фазе роста, микрофильтрацию проводят через мембранны с размером пор 0,2 мкм, после чего проводят ультрафильтрацию через мембранны с порогом задержания веществ 150 - 200 КД в режиме тангенциального потока.**

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2036232 C1

R U  
2 0 3 6 2 3 2  
C 1

Таблица 1

Эффективность технологических этапов производства пиобактериофага в зависимости от способа получения

Оцениваемые признаки по технологическим этапам	Результат		
	Прототип	Предлагаемый способ	Значимость различий
I. Выход биомассы фагов при культивировании протейного синегнойной палочки кишечной палочки стрептококка стафилококка клебсиелл пневмонии	$(8,3 \pm 3,3) \cdot 10^8$ $(1,1 \pm 0,24) \cdot 10^9$ $(2,6 \pm 0,45) \cdot 10^8$ $(3,3 \pm 1,14) \cdot 10^6$ $(6,86 \pm 2,8) \cdot 10^7$ Нет	$(5,98 \pm 2,8) \cdot 10^9$ $(1,1 \pm 0,49) \cdot 10^{10}$ $(8,2 \pm 1,8) \cdot 10^8$ $(3,0 \pm 0,29) \cdot 10^7$ $(3,3 \pm 0,86) \cdot 10^8$ $(8,2 \pm 2,9) \cdot 10^8$	P<0,001 P<0,05 P<0,05 P<0,05 P<0,05 Нет
II. Длительность процесса культивирования	$24 \pm 1$ ч	$3 \pm 1$ ч	P<0,001
III. Микрофильтрация (100л)	—	$4 \text{ м}^2$ фильтры 0,2 мкм 10-мин	—

Продолжение табл. 1

Оцениваемые признаки по технологическим этапам	Результат		
	Прототип	Предлагаемый способ	Значимость различий
IV. Очистка препарата от балластных веществ (метаболиты бактерий, белки) 100 л – ультрафильтрация	—	$8 \text{ м}^2$ (15 мин) удаление $98 \pm 1,1\%$ балластных веществ	—
V. Заключительная стерилизующая микрофильтрация (100 л)	100 свечей 7–8 ч	$5 \text{ м}^2$ фильтры 0,2 мкм 0,5–1 ч $5 \pm 1$ ч	—
VI. Длительность технологического цикла	$32 \pm 2$ ч		P<0,001

Таблица 2

Биологические свойства препарата пиобактериофага

Оцениваемые свойства препарата (сравниваемые признаки)	Результаты	
	Прототип	Предлагаемый способ получения
Специфическая антибактериальная активность в отношении бактерий клебсиелл пневмонии		
спектр действия (% лизирующихся штаммов)	Нет	$75 \pm 2\%$
активность по Алпельману	Нет	$10^5$ – $10^7$
Степень очистки препарата (по белку)	Нет	$98 \pm 1,1\%$
Токсичность при внутрибрюшинном введении		
хроническая	Патологические изменения в легких, печени и почек	Патологических изменений нет
острая	—	—

RU 2036232 C1

RU 2036232 C1